

제주지역 로타바이러스 위장관염 환아로부터 분리한 A군 로타바이러스의 VP7 Genotypes에 대한 연구

제주대학교 의과대학 소아과학교실, *내과학교실, † 중앙대학교 의과대학 미생물학교실

강기수 · 신경수 · Cui Xiu Ji* · 김원용†

VP7 Genotypes of Group A Rotavirus Isolated from Infants and Toddlers with Rotavirus Gastroenteritis in Jeju

Ki Soo Kang, M.D., Kyung-Sue Shin, M.D., Xiu Ji Cui, M.D.* and Wonyong Kim, Ph.D.†

Departments of Pediatrics and *Internal Medicine, Cheju National University College of Medicine, Jeju

† Department of Microbiology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Efficacy of the new rotavirus vaccines (Rotarix[®], RotaTeq[®]) recently developed can be affected by the rotavirus genotypes prevalent in communities. We performed this study to identify the recent distribution of rotavirus genotypes prevalent in Jeju.

Methods: Genotyping of human rotaviruses was performed using 81 samples collected from 154 inpatients and outpatients with rotavirus gastroenteritis at Cheju National University Hospital between July 2005 and June 2006. All six (1, 2, 3, 4, 8, 9) G serotypes were identified by amplification of segments of the gene for VP7 using the reverse transcription-polymerase reaction (RT-PCR).

Results: The results of RT-PCR for 81 samples were all positive. G typing of the VP7 protein showed that G1 was the most dominant circulating genotype (65.5%) followed by G2 (14.8%), G3 (13.6%), G8 (1.2%), G9 (1.2%), G4 (0%), and a combination of G1/G3 (3.7%).

Conclusion: This distribution of rotavirus VP7 genotypes in Jeju is different from that in other domestic areas; the most dominant circulating genotype was G1. (*Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 9: 147~152)

Key Words: Genotype, Rotavirus, Jeju

접수 : 2006년 7월 31일, 승인 : 2006년 8월 26일

책임저자 : 강기수, 690-756, 제주도 제주시 제주대학로 66, 제주대학교 의과대학 소아과학교실

Tel: 064-754-1126, Fax: 064-754-1109, E-mail: kskang@cheju.ac.kr

본 논문은 2005년도 제주대학교 의과대학 발전기금의 지원으로 이루어졌음.

서 론

전 세계적으로 로타바이러스는 5세 이하의 소아 중 매년 일억이천오백만 명 이상에서 설사를 일으키는 것으로 알려져 있다. 이 중 적어도 천팔백만 명이 입원을 필요로 하는 정도까지 이르며 아직까지도 매년 대략 육십만 명이 사망하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 로타바이러스는 특히 생후 6개월에서 24개월까지 영유아기 동안 설사로 병원에 입원하게 하는 가장 흔한 원인이다²⁾.

수 년 전 미국의 Wyeth-Ayest company에서 세계적으로 가장 높은 발생 빈도를 보이고 있는 G혈청형인 G1~G4를 혼합한 4가 약독화 생백신인 Rotashield[®] (Wyeth Lederle Vaccines, Philadelphia, USA)가 개발되었으나 부작용의 하나인 장중첩증으로 인하여 사용이 중단되었다^{3,4)}.

이후 국가 간 네트워크(surveillance network)를 구축하여 자국에서 유행하는 로타바이러스 혈청형을 규명하고 이를 기초로 한 백신을 개발하는 데 초점이 모아져 왔다⁵⁾. 최근에는 G1과 P1a [8]을 조직 배양관에서 약독화시켜 만든 백신인 Rotarix[®] (Glaxo-SmithKline, Rixensart, Belgium)가 개발되어 브라질, 멕시코 등에서 시판되었으며⁶⁾, G1~4와 P[8]을 혼합한 5가의 인간-소 유전자 재조합(pentavalent mixture of human-bovine reassortants) 경구용 백신인 RotatTeq[®] (Merck, Whitehouse Station, USA)이 개발되어 미국 FDA의 공인을 받은 상태이다⁷⁾. 이들 백신은 모두 장중첩증과 같은 부작용이 없는 것으로 밝혀졌다.

국내에서도 김 등⁸⁾외에 여러^{9~12)} 저자들이 지역별로 유행하는 로타바이러스의 혈청형에 대한 연구를 해왔으며 유행하는 VP7 genotypes이 서로 다른 것으로 보고되고 있다. 저자들은 제주지역에 유행하는 로타바이러스의 VP7 genotypes이 다른 지역과 어떤 차이점이 있는지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대변 검체 수집

2005년 7월부터 2006년 6월까지 급성 설사로 제주대학교병원에 외래를 방문 또는 입원하여 로타바이러스 위장관염으로 진단 받은 154명의 환아들 중 81명에서 검체를 수집하였다. 로타바이러스 감염의 진단은 면역크로마토그래피법(immunochromatography methods; SA Scientific[™], San Antonio, Texas, USA)을 이용하여 대변의 로타바이러스 항원을 확인하는 것으로 이루어졌다. 검체는 -80.0°C 냉동고에 저장하였다.

2. 로타바이러스 RNA 분리

냉동고에 저장되어 있던 검체를 실온에서 녹인 후 TRIzol[®] Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)를 사용하여 로타바이러스 dsRNA를 분리하였다. 분리한 dsRNA는 DEPC water에 용해하여 denaturation 시킨 다음, cDNA 합성 및 PCR 단계에 쓰일 일정한 양의 RNA를 제외한 나머지는 -80.0°C 냉동고에 다시 보관하였다.

3. cDNA 합성 및 G typing을 위한 PCR amplification

로타바이러스 RNA 분리 후 곧바로 시행하였다. Gouvea 등¹³⁾의 방법에 따른 RT-PCR과 일련의 multiplex PCR로 수행하였다. Primers는 Gouvea 등의 연구에 의거하여 제작하였다(Table 1).

1) RT and first PCR amplification: 분리한 RNA를 primers로 Beg9과 End9을 넣은 RT-PCR mixture에 섞어 thermocycler에 넣고 42°C 30분 후에 94°C 1분, 42°C 2분, 72°C 1분의 cycle을 25회 실시한 후 72°C 에서 7분간 extension시키고 4°C 에 저장하였다.

2) Second PCR amplification: Primers로 aBT1, aCT2, aET3, aDT4, aAT8 그리고 aFT9을 섞은 PCR mixture 19.5µL에 RT-PCR에 의하여 합성되고 증폭된 로타바이러스 DNA 0.5µL를 섞는다. 이것을 thermo-

Table 1. Sequences of Primers used for the Rotavirus VP7 Genotyping

Primer	Sequences (5'→3')	Target genotype
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	
End9	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	
aBT1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	G1
aCT2	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	G2
aET3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	G3
aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	G4
aAT8	GTCACACCATTTGTAAATTCG	G8
aFT9	CTAGATGTAACACTACTAC	G9

Modified from Gouvea et al. J Clin Microbiol 1990;28:276-82.

cycler에 넣고 94°C에 30분 후에 94°C 5분, 42°C 5분, 72°C 1분의 cycle을 30회 실시한 후 72°C에서 7분간 extension시키고 4°C에 보관하였다.

3) PCR product의 분석: 각각의 PCR 산물은 ethidium bromide가 혼합된 1.5% agarose gel을 이용하여 1× TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA, pH 8.0)에서 20분간 전기 영동하였다. 전기영동에서 나타난 PCR 산물의 밴드를 통해 genotypes을 결정하였다. G1 type은 749 bp (primer aBT1), G2는 652 bp (primer aCT2), G3는 374 bp (primer aET3), G4는 583 bp (primer aDT4), G8은 885 bp (primer aAT8) 그리고 G9은 306 bp (primer aFT9)의 증폭 산물을 각각 형성함으로써 type이 결정된다.

결 과

로타바이러스 위장관염으로 진단 받은 154명의 환아들 중 검체가 수집된 81명의 환아들의 평균 연령은 15.8±7.7개월이었다. 계절별 분포를 보면 2005년에는 7~11월까지 5명, 12월 17명, 2006년에는 1월 23명, 2월 18명, 3월 10명, 4월 4명, 5월 3명, 6월 1명으로 주로 겨울과 초봄에 집중 분포를 보였다.

81명의 환아들 모두에서 genotypes이 확인되었다. 분리된 로타바이러스의 VP7 genotypes을 보면 G1이 53예(65.5%)로 가장 많았고 그 다음으로 G2 12예(14.8%), G3 11예(13.6%), G8 1예(1.2%), G9 1예(1.2%), G4 0예(0%) 그리고 G1/G3 혼합형이 3예(3.7%)로 나

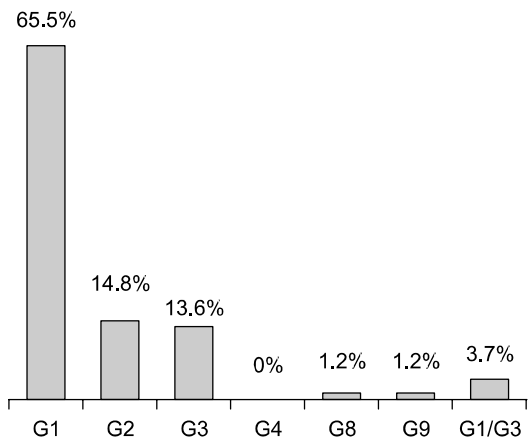


Fig. 1. Distribution of VP7 genotypes of group A rotaviruses isolated from 81 patients with rotavirus gastroenteritis between July 2005 and June 2006. G typing of the VP7 protein showed that G1 was the most dominant circulating genotype (65.5%) followed by G2 (14.8%), G3 (13.6%), G8 (1.2%), G9 (1.2%), G4 (0%), and a combination of G1/G3 (3.7%).

타났다(Fig. 1).

고 찰

Human rotavirus (HRV)는 1973년에 호주의 Bishop 등¹⁴⁾이 급성 설사증 환아의 십이지장 생검조직의 전자현미경 검사로 처음 발견되었다. Reoviridae 과에 속하는 로타바이러스는 바깥쪽 피막은 중화항체를

생성하며 바이러스의 주요 면역원성에 관여하는 VP7과 VP4으로 이루어져 있다. 중간 피막은 공통항원인 VP6로 구성된다¹⁵⁾. 로타바이러스는 VP6의 항원성에 따라 A~G까지 7개 군으로 분류되며 전 세계적으로 흔한 A군은 다시 VP7에 의한 G형(glycoprotein type)과 VP4에 의한 P형(protease-sensitive type)으로 재분류된다¹⁶⁾.

현재까지도 미국, 일본, 대만, 벨기에 그리고 헝가리 등의 대부분의 국외 나라들에서는 G1 type이 가장 흔한 VP7 genotype으로 보고되고 있다^{17~21)}. 또한 1987년에 Clark 등²²⁾이 처음으로 G9 type (WI61)을 보고한 이후로 세계적으로 점차적인 G9 type의 증가가 보고되고 있다^{17~21)}.

한편, 국내에서는 최근 수년간 서울 지역에서 김 등⁸⁾, Song 등¹¹⁾의 보고와 충청북도 지역에서 심 등¹²⁾의 보고 그리고 경남 마산지역의 소 등²³⁾의 보고에서 G2 type이 가장 흔한 혈청형으로 알려졌다. 또한 Kang 등²⁶⁾과 Kim 등²⁷⁾의 다기관 연구에서 우리나라에도 G9 type이 적지 않게 분포하고 있음을 보고하였다.

본 연구에서는 제주 지역에서 분리된 로타바이러스의 VP7 genotypes을 보면, G1이 53예(65.5%)로 가장 많았고 그 다음으로 G2 12예(14.8%), G3 11예(13.6%), G8 1예(1.2%), G9 1예(1.2%), G4 0예(0%) 그리고 G1/G3 혼합형이 3예(3.7%)로 나타났다. G1 type이 가장 많은 것은 외국의 여러 보고와 유사하지만 국내의 최근 보고들과는 다른 것을 알 수 있다. 또한 G4 type의 발생 예는 전혀 없어 뚜렷한 차이가 있음을 알 수 있다. Kang 등²⁶⁾의 다기관 연구 보고에 포함된 2002년 7월부터 2003년 6월까지 제주지역의 VP7 genotypes의 분포는 G1 23%, G2 14%, G3 31%, G4 0%, G9 32%로 나타나 본 연구 결과와 뚜렷한 차이가 있다. 이는 연구 기간이 서로 다르므로 유행하는 로타바이러스의 genotype의 변화가 있는 것으로 생각된다.

국내의 다른 지역과 전혀 다른 제주지역의 VP7 genotypes의 분포는, 앞서 저자와 김²⁴⁾이 본 학회지에 발표했던 제주지역의 로타바이러스 위장관염의 유행 양상이 국내 여타 지역과 뚜렷한 차이가 나는

이유를 설명하는 근거가 될 수 있으리라 생각된다. 이에 대한 체계적인 설명을 위해서는 로타바이러스 감염의 유행 양상과 genotypes의 분포에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 본다.

로타바이러스가 처음 발견된 이후 여러 가지 경구용 약독화 생백신이 개발되었으나 모두 실패하였다. 각 혈청형에 따라 서로 교차방어가 되지 않는 바이러스의 특성으로 인하여 모든 로타바이러스 혈청형에 대한 감염을 효과적으로 예방하기 위한 백신 개발에는 어려움이 많다.

최근에, 오랜 연구 끝에 로타바이러스 감염을 예방할 수 있는 대표적인 백신 2가지가 개발되었는데 이중 하나는 RotaTeq[®] (Merck, Whitehouse Station, USA)으로 G1~4와 P[8]을 혼합한 5가의 인간-소 유전자 재조합 경구용 백신이다. 다른 하나는 Rotarix[®] (GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium)로 G1과 P1a [8]을 조직 배양관에서 약독화시켜 만든 백신이다. 로타바이러스에 의한 중증 설사에 대한 효능은 각각 98%, 85%로 RotaTeq이 더 높다. 두 가지 백신 모두 앞서 개발되었던 Rotashield[®] (Wyeth Lederle Vaccines, Philadelphia, USA)의 부작용인 장중첩증의 위험은 없는 것으로 증명되었다^{6,7,25)}.

해외에서 새로이 개발된 두 개의 로타바이러스 백신은 국내에서도 임상 시험을 마쳤거나 진행 중에 있다고 하며²⁸⁾ 그 결과는 아직 보고되지 않은 상태이다. 백신의 효과는 VP4 type에 의해서도 많이 좌우되는데 본 연구에서는 아직 이루어지지 못했다. 국내의 여러^{8,9,11,26,27)} 보고에서는 G4P[6]와 G2P[4]가 가장 흔한 형태이며 G9P[8]도 적지 않게 보고되고 있다.

국내의 여러 보고들과 함께 본 연구의 결과도 새로운 백신의 효능 여부와 접종시기를 결정하는 기초 자료의 하나가 되리라고 본다.

요 약

목 적: 최근 새로이 개발된 두 개의 백신(Rotarix, RotaTeq)의 효능은 지역사회에 유행하는 로타바이러스 genotype에 따라 영향을 받을 수 있다. 저자는 제

주지역에 유행하는 로타바이러스 genotype의 분포를 알아보고자 하였다.

방 법: 2005년 7월부터 2006년 6월까지 급성 설사로 제주대학교병원 소아과에 내원 또는 입원하여 로타바이러스 위장관염으로 진단 받았던 154명 중 81명에서 대변 검체를 수집하였다. 대변 검체에서 RNA를 추출하여 역전사-중합효소 반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)을 시행하여 로타바이러스 VP7 genes을 증폭하였으며 여섯 개(1, 2, 3, 4, 8, 9)의 G 유전형을 확인하였다.

결 과: 역전사-중합효소 반응을 시행한 81개의 대변 검체에서 모두 VP7 유전자가 증폭됨을 확인하였다. 이들 검체에서 VP 7 단백질의 유전형을 보면 G1이 53예(65.5%)로 가장 많았고 그 다음으로 G2 12예(14.8%), G3 11예(13.6%), G8 1예(1.2%), G9 1예(1.2%), G4 0예(0%) 그리고 G1/G3 혼합형이 3예(3.7%)로 나타났다.

결 론: 제주 지역의 로타바이러스 VP7 genotypes의 분포는 국내의 다른 지역들과 달랐으며, G1 유전형이 가장 흔하게 검출되었다.

참 고 문 헌

- 1) Bass DM. Rotavirus and other agents of viral gastroenteritis. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, editors. Nelson textbook of pediatrics. 17th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2004:1081-3.
- 2) Bass DM, Estes MK. Viral infections. In: Walker WA, Goulet O, Kleinman RE, Sherman PM, Shneider BL, Sanderson IR, editors. Pediatric gastrointestinal disease. 4th ed. Hamilton: BC Decker, 2004:668-72.
- 3) Karmariz P, France EK, Destefano f, Black SB, Shenefield H, Ward JI, et al. Population-based study of rotavirus vaccination and intussusception. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:410-6.
- 4) Murphy TV, Gargiullo PM, Massoudi MS, Nelson DB, Jumaan AO, Okoro CA, et al. Intussusception among infants given an oral rotavirus Vaccine. *N Engl J Med* 2001;344:564-72.
- 5) Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 2005;15:29-56.
- 6) Ruiz-Palacios GM, Perex-Schael I, Velazquez ER, Abate H, Breuer T, Clemens SC, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2006;354:11-22.
- 7) Clark HF, Offit PA, Plotkin SA, Heaton PM. The new pentavalent rota-virus vaccine composed of bovine (strain WC3)-human rotavirus reassortants. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:577-83.
- 8) 김효현, 강성훈, 김원용. 서울 지역 영아 설사 환자로 부터 분리한 로타바이러스의 유전자형 및 G9 VP7 유전자 염기서열. *J Bacteriol Virol* 2005;35: 67-74.
- 9) 김은정, 서병태, 박석기, 이정자. 서울 지역 설사 환자에서 분리한 A군 rotavirus의 multiplex PCR을 이용한 VP4, VP7 유전자형. *J Bacteriol Virol* 2002;32:291-7.
- 10) Park HK, Woo SY, Seoh JY, Chong YH, Seo JW. VP7 Genotypes of human rotavirus from hospitalized children with severe diarrhea by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Korean Soc Microbiol* 1997;32:675-83.
- 11) Song MO, Kim KJ, Chung SI, Lim IS, Kang SY, Kim WY. Distribution of human group A rotavirus VP7 and VP4 circulating in Seoul, Korea between 1998 and 2000. *J Med Virol* 2003;70:324-8.
- 12) 심재건, 권재봉, 강신영. 충주 지역 설사 환자의 rotavirus G serotype 분포에 관한 연구. *대한소아소화기 영양학회지* 2000;3:41-6.
- 13) Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990;28:276-82.
- 14) Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973;8:1281-3.
- 15) Desselberger U, McCrae MA. The rotavirus genome. *Curr Microbiol Immunol* 1994;185:31-66.
- 16) Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, et al. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis* 1996;174(Suppl 1):30S-36S.
- 17) Griffin DD, Kirkwood CD, Parashar UD, Woods PA, Bresee JS, Glass RI, et al. Surveillance of rotavirus strains in the United States: identification of Unusual strains. *J Clin Microbiol* 2000;38:2784-7.

- 18) Zhou Y, Li L, Kim BS, Kaneshi K, Nishimura S, Kuroiwa T, et al. Rotavirus infection in children in Japan. *Pediatr Int* 2000;42:428-39.
 - 19) Zhou Y, Supawadee J, Khamwan C, Tonusin S, Peerakome S, Kim BS, et al. Characterization of human rotavirus serotype G9 isolated in Japan and Thailand from 1995 to 1997. *J Med Virol* 2001;65:619-28.
 - 20) Rahman M, Matthijssens J, Goegebuer T, Leener KD, Vanderwegen L, Donck I, et al. Predominance of rotavirus G9 genotype in children hospitalized for rotavirus gastroenteritis in Belgium during 1999~2003. *J Clin Virol* 2005;33:1-6.
 - 21) Banyai K, Gentsch JR, Glass RI, Uj M, Mihaly I, Szucs G. Eight-year survey of human rotavirus strains demonstrates circulation of unusual G and P types in Hungary. *J Clin Microbiol* 2004;42:393-7.
 - 22) Clark HF, Hoshino Y, Bell LM, Groff J, Hess G, Bachman P, et al. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J Clin Microbiol* 1987;25:1757-62.
 - 23) 소경진, 이미현, 마상혁, 김병철, 양재명. 2000~2001 경상남도에 유행한 로타바이러스의 유전자형. *소아감염* 2004;11:59-72.
 - 24) 강기수, 김재리. 제주지역에서 최근 수년간 관찰된 rotavirus 위장관염의 발생 양상. *대한소아소화기영양학회지* 2005;8:113-6.
 - 25) Plotkin SA. New rotavirus vaccines. *Pediatr Infect Dis* 2006;25:575-6.
 - 26) Kang JO, Kilgore P, Kim JS, Nyambat B, Kim JG, Suh HS, et al. Molecular epidemiological profile of rotavirus in South Korea, July 2002 through June 2003: emergence of G4P [6] and G9P [8] strains. *J Infect Dis* 2005;192:57S-63S.
 - 27) Kim JS, Kang JO, Cho SC, Jang YT, Min SA, Park TH, et al. Epidemiological profile of rotavirus infection in the Republic of Korea: results from prospective surveillance in the Jeongeub district, 1 July 2002 through 30 June 2004. *J Infect Dis* 2005;192:49S-56S.
 - 28) 김정수. 로타바이러스 백신. *한국소아감염병학회 춘계학술대회* 2006:44-8.
-